



日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

#6  
Plunkett  
6/15/99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1997年12月26日

出願番号  
Application Number:

平成 9 年特許願第 3 6 1 2 8 2 号

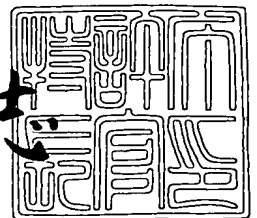
出願人  
Applicant (s):

財団法人癌研究会  
鶴尾 隆  
株式会社 伊藤園

1998年12月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3103414

【書類名】 特許願

【整理番号】 P972431

【提出日】 平成 9年12月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明の名称】 テロメレース阻害剤

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区宮坂 3-36-6

    【氏名】 鶴尾 隆

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都豊島区東池袋 2-6-2 ロイヤルアネックス 301

    【氏名】 イマド ナサニ

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都足立区東和 4-24-10-602

    【氏名】 清宮 啓之

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都杉並区南荻窪 4-8-13

    【氏名】 菅野 晴夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000173588

    【氏名又は名称】 財団法人 癌研究会

【特許出願人】

    【識別番号】 591031452

    【氏名又は名称】 鶴尾 隆

【特許出願人】

    【識別番号】 591014972

    【氏名又は名称】 株式会社 伊藤園

【代理人】

【識別番号】 100070219

【弁理士】

【氏名又は名称】 若林 忠

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100100893

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 勝

【選任した代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015129

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 テロメレース阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カテキンを有効成分とすることを特徴とするテロメレース阻害剤。

【請求項2】 カテキンが、エピガロカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキンガレートまたはエピカテキンである請求項1に記載のテロメレース阻害剤。

【請求項3】 薬学的に許容される担体または希釈剤を含む請求項1または2に記載のテロメレース阻害剤。

【請求項4】 カテキンを90～95重量%含む請求項1～3のいずれかに記載のテロメレース阻害剤。

【請求項5】 カテキンを有効成分とすることを特徴とする癌予防または制癌剤。

【請求項6】 カテキンが、エピガロカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキンガレートまたはエピカテキンである請求項5に記載の癌予防または制癌剤。

【請求項7】 薬学的に許容される担体または希釈剤を含む請求項5または6に記載の癌予防または制癌剤。

【請求項8】 カテキンを90～95重量%含む請求項5～7のいずれかに記載の癌予防または制癌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カテキンを有効成分とし、癌予防剤、抗癌剤、癌進展遅延剤等として有用なテロメレース阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌治療においては、種々の外科的な処置、内科的な処置及び放射線学的抗腫瘍

療法、あるいはこれらの各種処置の組合せが開発されている。更に、癌の発生を予防するための方法や、すでに発生した癌でもその進行をできるだけ遅延させて、致命的な状態への推移を防止する予防医学的な処置についての研究も盛んにおこなわれるようになってきている。いずれにしても、癌の発生から進行に至るメカニズムを更に解明することは効果的な癌の予防及び治療のための方法を開発する上で必須の要件となっている。

## 【0003】

癌治療における新しいターゲットとしての1つとしては、最近になってテロメラーゼという酵素の存在が注目されるようになった。このテロメラーゼは、逆転写酵素の1つで細胞増殖における染色体の安定性に関与しているテロメアDNA（以下テロメアという）の合成を行う酵素である。このテロメアは、染色体の末端に直鎖状のDNAにより形成された部分であり、テロメアが存在することで染色体自身を安定化させ、染色体同士の結合による変異等を防止している。

## 【0004】

テロメアに関しては、ヒト組織でのテロメアが年齢とともに短縮していくことに加えて、テロメアの短縮が進むと細胞が死滅することが解明され、テロメアの老化や細胞の分裂寿命との関係が明らかにされつつある。また、癌細胞におけるテロメアが周囲の正常細胞に比較して短い等の報告もあり、テロメアは癌研究の対象として注目を集めるものとなった。

## 【0005】

更に、全癌種の85%に当る癌におけるテロメア合成酵素であるテロメラーゼ活性の検出が報告された[例えば、Kim, N. W. et al, Science, 266, 2011-2015 (1994); Healy, K. C., Oncol. Res., 7, 121-130 (1995); Raymond, E. et al, Biotechnology, 7, 583-591 (1996)]。これとは対照的に、殆どの正常体細胞はテロメラーゼ陰性であることがわかっている。こうした背景から、テロメア及びテロメラーゼは、癌治療における強力なターゲットとして更に注目されるに至っている。

## 【0006】

一方、茶と癌予防作用や抗癌作用に関する研究に関しては、ヤングら [Yang, C. S. & Wang, Z-Y, J. Natl. Cancer Inst., 85, 1038-1049 (1993)] 及びフジキら [Fujiki, H. et al, Nutrition reviews, 54, 67-70 (1996)] には、疫学的立場からみた緑茶の制癌効果に関する総説が記載されている。また、リアオら [Liao, S. et al, Cancer Letter 96, 239-243 (1995)] には、実験腫瘍ヌードマウスにおける茶に含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) の癌細胞増殖抑制効果が報告されている。更に、タニグチら [Taniguchi, S. et al, Cancer Letters, 65, 51-54 (1992)] には、EGCGの経口投与による悪性黒色種細胞の転移抑制が報告されている。しかしながら、これらの文献のいずれにおいても、緑茶あるいはEGCGの癌に対する作用機構についてはなんら記載されていない。特に、これらの文献は、緑茶やEGCGのテロメレースに対する作用や、テロメレースに関連した制癌作用のメカニズムについてなんら記載しないものである。

## 【0007】

## 【発明が解決しようとする課題】

癌細胞におけるテロメレース活性を阻害すると、癌細胞自身の有する染色体の安定性が低下し、癌細胞の寿命を短縮化できるとの仮説に基づいて、テロメレース阻害剤の癌治療への応用が期待されるが、有効なテロメレース阻害活性を有し、かつ医薬用としての特性を満足し得る物質についての報告は未だなく、更には、テロメレース阻害剤の使用によって癌細胞寿命の効果的な短縮化に成功した例についての報告もないのが現状である。

## 【0008】

本発明の目的は、テロメア及びテロメレースと癌との関係の解明や、癌予防及び癌治療において有用なテロメレース阻害活性を有し、医薬用としての安全性や好適な特性を有するテロメレース阻害剤を提供することにある。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明のテロメレース阻害剤は、カテキンを有効成分として含有することを特徴とする。本発明のテロメレース阻害剤は、テロメレース阻害自体あるいはテロメレース阻害を利用した各種の実験に用いる試薬として、更には、医薬用としての形態を付与することで、癌予防剤、抗癌剤等として利用することができる。なお、本発明のテロメレース阻害剤を用いることで、癌細胞の寿命を短縮して死滅させたり、癌増殖・悪性化の遅延による癌進行の抑制等の効果を得ることが可能である。

## 【0010】

## 【発明の実施の形態】

本発明においてテロメレース阻害剤の有効成分として利用するカテキンは、市販のものや、公知の方法によって茶から抽出分離したものを利用することができる。

## 【0011】

茶からの抽出分離は、例えば、茶葉を熱水または親水性有機溶媒で抽出処理して得られる抽出物からカフェイン等の天然高分子類をクロロホルムで抽出除去し、更に酢酸エチル等の有機溶媒で抽出処理することで茶カテキンの混合物を得た後、この混合物からアセトンなどの親水性有機溶媒を溶出用剤として用いたカラムクロマトグラフィーによってカテキンを分離することができる。

## 【0012】

本発明において用い得るカテキンとしては、例えば、(一) -エピガロカテキンガレート (EGCG: epigallocatechin gallate)、(一) -エピガロカテキン (EGC: epigallocatechin)、(一) -エピカテキンガレート (ECG: epicatechin gallate) 及び (一) 又は (+) -エピカテキン (EC: epicatechin) 等を挙げることができ、本発明の効果が得られる範囲内でこれらの誘導体も利用できる。これらのカテキンの中では、エピガロカテキンガレート及びエピカテキンガレートが好ましく、エピガロカテキンガレートが特に好ましい。

## 【0013】

本発明におけるテロメレース阻害剤は、有効成分としてのカテキンに、必要に

応じて適当な媒体に含有させて調製することができる。例えば、植物油、乳化剤（Tween、Emulgene等）、アスコルビン酸（抗酸化剤）を用いてカテキンをO/W（oil-in-water）型エマルジョン中に含有させ、これを凍結乾燥したものが好適に利用できる。乾燥凍結前の状態での配合の具体例としては、植物油及び乳化剤等を合計で5重量%、抗酸化剤を0.1重量%、カテキンを5重量%含有させたものを挙げるることができる。阻害剤中のカテキンの含量は好ましくは90～95重量%とし、必要に応じて希釈して用いることができる。

## 【0014】

テロメレース阻害作用を有するカテキンを活性成分として配合した医薬組成物は、癌予防剤及び制癌剤として好適に利用できる。この制癌剤の作用には、癌細胞を直接攻撃して死滅させる抗癌作用や癌進展（悪性化）を遅延する作用等も含まれる。このような医薬組成物として利用する場合には、カテキンを有効成分として常法によって治療目的に応じた各種の形態とすることができる。医薬組成物の形態としては、例えば、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、坐薬等の固形製剤、注射剤、懸濁剤、シロップ剤、乳剤等の液体製剤、貼剤等の半固形剤等を挙げるることができる。

## 【0015】

医薬組成物として利用する場合の有効成分であるカテキンの含有量は、例えば錠剤もしくはカプセル剤の剤形で、100～500mg（剤形の総重量あたり90～95重量%）程度とすることができる。医薬組成物として利用する場合の投与量は、処置目的、処置対象の状態等に応じて適宜選択されるが、例えば、有効成分化合物の量として、例えば、成人1日当り500～2000mg程度とすることができる。また、上述したO/W型のエマルジョンの凍結乾燥物は製剤として、更には製剤の原料としても好適に利用できる。

## 【0016】

また、本発明における医薬組成物には、カテキンの所望とする作用を阻害しない範囲内で、製剤において用いられている種々の添加剤を含有させることができる。更に、本発明のテロメレース阻害剤を用いた癌治療においては、テロメレー



ス阻害剤によってダメージを受けている癌細胞に対して化学療法剤（抗癌剤）等を併用することで、更に効果的な癌治療を達成することも可能である。

【0017】

本発明のテロメレース阻害剤の有効成分のカテキンは、茶の成分中から得られるものであり、安全性も高く、しかも少量で有効な活性を得ることができ、医薬用として、特にテロメレースを発現している癌に対する予防用、あるいは治療用の医薬として極めて好適である。

【0018】

#### 【実施例】

以下実施例により本発明を更に詳細に説明する。なお、「%」は特に指定のない限り「重量%」を示す。

【0019】

#### 実施例1

（非細胞系でのテロメレース活性の測定）

EGCG、EGC、ECG及びEC（各シグマ社製）のテロメレース阻害活性を、キムら [Kim, N. W. et al, Science, 266, 2011-2015 (1994)] に記載のTRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) 法に従って以下に示す操作によって測定した。

#### （1）細胞抽出液の調製

細胞を氷冷PBS（リン酸緩衝生理食塩水）で洗浄した後、再度PBSに懸濁して細胞数を算定した。この細胞懸濁液を遠心して得た細胞塊をTRAPアッセイ緩衝液 [10mM Tris-HCl、pH7.5、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、0.5% CHAPS、10% グリセリン、5mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochlorine: 4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニル フルオライド ハイドロクロライン] に懸濁した後、液体窒素にて急速冷凍した。これを融解後氷浴にて30分間静置して抽出処理を行い、得られた抽出液を遠心して上清を活性測定用細胞

抽出液として採取した。

## (2) 反応及び反応後の処理

一定量（細胞200～1000個分に相当）の細胞抽出液に、試験化合物、TSプライマー（50 ng）と50 μMのdNTPs及びT4 g32蛋白質（ベリンガーマンハイム社）を加え、20℃で30分間インキュベートした。反応終了後、反応液にCXプライマー（100 ng）及びPCRの内部標準としてITAS（ $10^{-18}$  g）を加え、AmpliTaq DNAポリメラーゼ（2 U）の存在下で、（94℃40秒→50℃40秒→72℃60秒）×35サイクル→72℃2分の条件でPCRを行いPCR産物を得た。

【0020】

なお、上記の操作で用いたプライマーの有する塩基配列は以下のとおりである。

TSプライマー：

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'（配列番号：1）

CXプライマー：

5'-GTGCCCTTAACCCCTTACCCTTACCCTAA-3'（配列番号：2）

ITAS：

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTGTGAATGAGGCCTTCGAGGCTCTGAAGAGAAGCACCCCTGCTCAACCCCAAC  
CAGCGGCTGCCTAAGGTGGAGATCCTGCGCAGTGCCATCCAGTACATTGAGCGCCTATTAGGGTAAGGGTAA  
GGGTAAGGG-3'（配列番号：3）

*in vitro*の反応系においてテロメラーゼはTSプライマーの3'末端にテロメアを付加合成する。CXプライマーの3'末端側24塩基のうち21塩基がテロメア配列と一致し、TSプライマーとCXプライマーの組合せでPCRを行うことによりテロメア産物を増幅することができる。ITAS配列の5'末端部及び3'末端部は、それぞれTSプライマー及びCXプライマーの配列と一致させてある。

## (3) 反応生成物の検出・定量

上記の操作で得られたPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、SYBRグリーン（宝酒造社）で染色してDNAのバンドをUVトランスイ

ルミネーター照射下で検出した。なお、検出されたバンドは写真撮影しておいた。各バンドの強さをNIH Image 1.60ソフトウェアで定量化し、ITASフラグメントのバンド（対照）との相対強度をテロメラーゼ活性値とした。

#### 【0021】

得られた結果を図1に示す。図1から、5種のカテキンのなかでは、EGCGが最も強力な阻害活性を有することがわかる。

#### 【0022】

##### 実施例2

（EGCGのテロメラーゼ阻害活性）

EGCGの反応液中での濃度を、0.1～20  $\mu$ Mの範囲において8段階で変化させて、各濃度でのテロメラーゼ活性を、プライマーとしてTSを2種の異なる濃度で用いる以外は、実施例1と同様にしてEGCGの各濃度におけるテロメラーゼ活性を測定した。得られた結果を図2に示す。図2の結果から測定値のディクソンプロットを行い、 $K_i$  値を求めたところ約100 nMであった（図2、3参照）。

#### 【0023】

##### 実施例3

（細胞内におけるテロメラーゼ阻害活性）

単芽球白血病細胞（monoblastoid leukaemia cell）U937（ATCC：アメリカン タイプ カルチャー コレクション）及び結腸腺癌細胞（colon adenocarcinoma cell）HT29におけるEGCGのテロメラーゼ活性阻害を調べた。

#### 【0024】

U937細胞用の培地としては、RPMI1640培地（ニッスイ社）に10%FBS（fetal bovine serum）を追加したものを、HT29細胞としてはRPMI1640培地に5%FBS及び5%FCS（fetal calf serum）を追加したものをそれぞれ用いた。

#### 【0025】

15  $\mu$ MのEGCG溶液中で各細胞を2時間インキュベートして処理してから、PBS中で洗浄した。洗浄した細胞を、RPMI 1640培地（血清を含有しないもの）に $2 \times 10^6$ 個/mlの濃度で懸濁させ、これにストレプトリジンO（シグマ社製、5 U/ml）、TSプライマー（10  $\mu$ M）、スベルミジン（1 mM）及びイミプラミン（100  $\mu$ M）を添加して、室温で10分間インキュベートした。なお、ストレプトリジンOは細胞内への物質の膜透過性を向上させる物質であり、これによってTSプライマー等が細胞内に取り込まれる。

【0026】

透過反応を10% FBSを含む同一培地の同量添加によって停止させてから、更に1時間細胞懸濁液を室温でインキュベートして細胞膜をシールした。こうして得られたTSプライマー等が取り込まれている細胞を、室温で1時間インキュベートして細胞膜被覆を行うと同時に、細胞内テロメレース反応を進行させた。次に、細胞をPBSで2回洗浄してからペレット化した後、冷凍処理してからTRAP法によるテロメレース産物の検出に用いた。

【0027】

すなわち、細胞を氷冷PBSで洗浄した後、再度PBSに懸濁して細胞数を算定した。この懸濁液を遠心して得た細胞塊をTRAPアッセイ緩衝液に懸濁した後、液体窒素にて急速冷凍した。これを融解後氷浴にて30分静置し、得られた抽出液を遠心してその上清を細胞抽出液として採取した。一定量（細胞200～1000個分に相当）の細胞抽出液にTSプライマー（344 nM）とACXプライマー（385 nM）、50  $\mu$ MのdNTPs、T4 g32蛋白質（ベーリンガーマンハイム社）、PCRの内部標準としてTSNT（0.02 pM）及びNTプライマー（385 nM）を加え、AmpliTaq DNAポリメラーゼ（2 U）の存在下で、（94℃40秒→50℃40秒→72℃60秒）×35サイクル→72℃2分の条件でPCRを行いPCR産物を得た。

この反応の使用したプライマーの有する塩基配列は以下のとおりである。

ACXプライマー：

5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3'（配列番号：4）

TSNT：

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3' (配列番号: 5)

NTプライマー:

5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3' (配列番号: 6)

【0028】

このようにして得られたPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、これをSYBRグリーン(宝酒造社)で染色してDNAのバンドをUVトランスイルミネーター照射下で検出した。各バンドの強さをNIH Image 1.60ソフトウェアで定量化し、ITASフラグメントのバンド(対照)との相対強度をテロメレース活性値とした。

【0029】

なお、上記のPCRは、テロメレースによって伸長化された部分を、TSプライマーをPCRでの前方向伸長用プライマーとして、ACXプライマーを逆方向伸長用プライマーとしてそれぞれ用いたものである。また、36bpの内部標準(TSNT)及びそれ自身の逆方向伸長用プライマー(NT)は、キムら[(Kim, N. W. & Wu, F., Nucleic Acids Res., 25, 2595-2597 (1997))]の記載に従って使用した。

【0030】

得られた結果を図4に示す。図4の結果から、細胞をEGCGで処理することによって細胞内テロメレース活性が顕著な阻害を受けたことがわかる。なお、TSプライマー非存在下においてもシグナルが若干検出されたが、これは内因性テロメア配列などに由来するものであると予想され、EGCG処理で同様に減少した。

【0031】

実施例4

(EGCGのテロメレースへの作用機構)

細胞を15  $\mu$ MのEGCGで2時間処理した後、氷冷PBSで洗浄した。遠心して得た細胞塊をTRAPアッセイ緩衝液に懸濁した後、液体窒素で急速冷凍した。これを融解後氷浴にて30分間静置し、得られた抽出液を遠心して上清を細胞抽出液として採取した。一定量(細胞200~1000個分に相当)の細胞抽

出液に、試験化合物、TSプライマー（50 ng）と50  $\mu$ MのdNTPs及びT4 g32蛋白質（ベーリンガー・マンハイム社）を加え、20℃で30分間インキュベートした。反応終了後、反応液にCXプライマー（100 ng）を加え、AmpliTaq DNAポリメラーゼ（2 U）及びITAS（10<sup>-18</sup> g）の存在下で、（94℃40秒→50℃40秒→72℃60秒）×35サイクル→72℃2分の条件でPCRを行いPCR産物を得た。このPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、SYBRグリーン（宝酒造社）で染色してDNAのバンドをUVトランスイルミネーター照射下で検出した。各サンプルのバンドの強さをNIH Image 1.60ソフトウェアで定量化し、ITASフラグメントのバンドとの相対強度をテロメレース活性値とした。

【0032】

以上の操作をU937細胞及びHT-29細胞のそれぞれについて行ったところ、これらの細胞のいずれにおいても、EGCG処理は*in vitro*テロメレース活性に影響を与えなかった。このことと、実施例1～3の結果から、EGCGは細胞内で直接的かつ可逆的にテロメレース活性を阻害し、この阻害は細胞内情報伝達機構を介するものではないことが明らかになった。

【0033】

実施例5

U937細胞及びHT29細胞のそれぞれについて、EGCGを含む培地と含まない培地での継代培養を行い、EGCG添加の細胞増殖への影響を調べた。培地としては実施例3と同様のものを用いた。

【0034】

U937細胞については5つの継代培養系列を作成し、HT29細胞については9つの継代培養系列を作成した。各系列の最初の培養は、保存細胞株からの細胞を10 cm培養皿あたり5×10<sup>5</sup>個の細胞数で播種して行った。各細胞の1系列についてはEGCGを追加していない培地で培養した対照系列とし、残りの系列についてはEGCGを15  $\mu$ M追加した培地で培養した。

【0035】

4日毎に細胞の植え継ぎとサンプリングを行い、細胞数の計測を行った。培地

については毎日新鮮なものと交換した。

【0036】

得られた結果を図5 (U937細胞) 及び図6 (HT29細胞) に示す。—○—はEGCGを含まない培地で培養した対照系列であり、図5における—●—、—▲—及び—■—は、15  $\mu$ MのEGCGを含んだ培地で培養した系列群であり、いずれも53日 (—●—)、44日 (—▲—)、29日 (—■—) でクライシスに入った後、老化細胞と類似の形態を示した。図6における—▲—及び—●—は、15  $\mu$ MのEGCGを含んだ培地で培養した系列群であり、いずれも75日 (—▲—)、57日 (—●—) でクライシスに入った後、老化細胞と類似の形態を示した。

【0037】

細胞形態との関連においては、U937細胞ではPD25付近で、HT29細胞ではPD60付近で独特な細胞形態の変化 (U937細胞では細胞形状が丸みを帯び、個々の細胞が独立で存在するようになり、HT29細胞ではプラズマ膜に損傷が見られる) を示すクライシスに入り、U937細胞では、PD40までに、HT29細胞ではPD70までに死滅に至った。なお、PDは、細胞の増殖における細胞個数が倍増するサイクル数であり、血球計算板を用いて細胞数をモニタリングすることによって算出した。

【0038】

細胞の形態変化が一次的でないことは、形態変化を生じた細胞をEGCGを含まない培地に移して培養しても細胞の形態はもとの状態に戻らず、形態の変化が維持されたことによって確認した。

【0039】

クライシスにあるPD57～60の間のHT29細胞を集め、ゲノムDNAを塩析/エタノール析出法 (ストラテゲン社製: Stratagene) によって調製した。なお、単離されたゲノムDNAが分解等を受けていないことはゲル電気泳動法 (エチジウムブロマイド染色) で確認した。

【0040】

単離したゲノムDNA (10  $\mu$ g) をHinf I及びRsa Iで消化し、得ら

れた消化物のサザンブロテイングを常法に従って行った後、Tel o Q u a n t  
アッセイキット（ファルミンジェン社製：PharmMingen）を用いてD  
NA断片の検出を行った。

## 【0041】

得られた結果を図7に示す。通常のゲノムDNAには制限酵素H i n f I及び  
R s a Iによって切断を受ける部位が非常に多数存在するが、サブテロメア～テ  
ロメア領域においてはこのような切断部位は存在していない。従って、ゲノムD  
NAを上記の制限酵素によって消化すれば、テロメア領域のみが未消化のまま残  
ることになる。このDNA断片をTRF（terminal restriction fragment）と呼び、サザンブロット法でこれを検出することによ  
って細胞のテロメア長を観察することが可能である。EGCG処理または非処  
理のHT-29細胞について上記の操作で得られたTRFをTel Q u a n tア  
ッセイキットを用いて検出した。得られたシグナルについてデンシドメトリー解  
析を行った結果が図7である。EGCG処理によってクライシス期に入った細胞  
（-●-）では、非処理の細胞（-○-）に対して約1.1 kbのTRF短縮が  
認められた。更に、EGCG処理細胞では、連続処理がHT-29細胞でのテロ  
メア縮退を起すことが明らかとなった。

## 【0042】

また、フローサイトメトリーを用いた常法によってクライシスに入る前の細胞  
についてのDNA含有量の分析をしたところ、U937細胞及びHT29細胞と  
もに、異数倍体細胞の50～100%の増加、細胞周期G2/Mフラクションの  
10～20%の増加がそれぞれ見られた。

## 【0043】

これらの結果を総合すると、EGCGによる細胞内でのテロメレース阻害が、  
細胞がクライシスから死滅に至った原因であることは明白である。

## 【0044】

## 【発明の効果】

本発明において用いられるカテキンは、従来にない強力なテロメレース阻害活  
性を有するものであり、本発明によってテロメレースと癌との関係の解明におい



て有用なテロメレース阻害剤や、癌予防及び癌治療において有用なテロメレース阻害活性を有し、医薬用としての安全性や好適な特性を有するテロメレース阻害剤を提供することができる。

【0045】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用TSプライマー

配列

AATCCGTCGA GCAGAGTT 18

配列番号：2

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用CXプライマー

配列

GTGCCCTTAA CCCTTACCCT TACCCTAA 28

配列番号：3

配列の長さ：150

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用内部標準ITAS

配列

AATCCGTCGA GCAGAGTTGT GAATGAGGCC TTCGAGGCTC TGAAGAGAAG CACCCTGCTC 60  
AACCCCAACC AGCGGCTGCC TAAGGTGGAG ATCCTGCGCA GTGCCATCCA GTACATTGAG 120  
CGCCTATTAG GGTAAGGGTA AGGGTAAGGG 150

配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用ACXプライマー

配列

GCGCGGCTTA CCCTTACCCT TACCCTAACC 30

配列番号：5

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用内部標準TSNT

配列

AATCCGTCGA GCAGAGTTAA AAGGCCGAGA AGCGAT 36

配列番号：6

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用NTプライマー

配列

ATCGCTTCTC GGCCTTTT 18

【図面の簡単な説明】

【図1】

各化合物のテロメレース活性を示す図である。

【図2】

EGCG濃度に応じたテロメレース活性の変化を示す図である。

【図3】

EGCGのテロメレース活性阻害に関するディクソンプロットを示す図である。

【図4】

EGCGの細胞内でのテロメレース阻害活性を示す図である。

【図5】

EGCGの細胞増殖への影響を示す図である。

【図6】

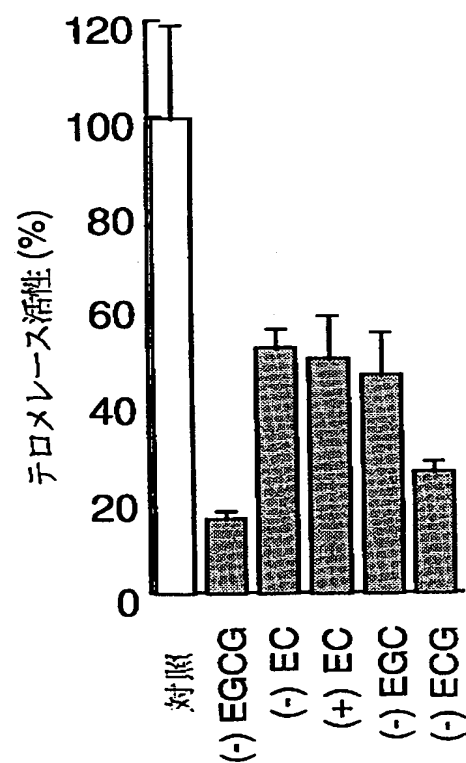
EGCGの細胞増殖への影響を示す図である。

【図7】

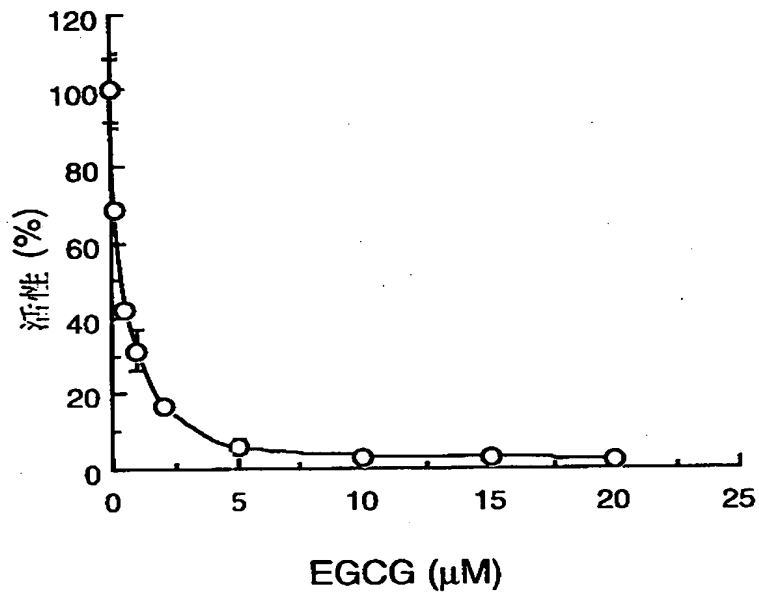
EGCG (15  $\mu$ M) の存在下または非存在下での継代培養時におけるPD6  
7～70のHT29細胞からのTRFの長さの分布を示す図である。

【書類名】 図面

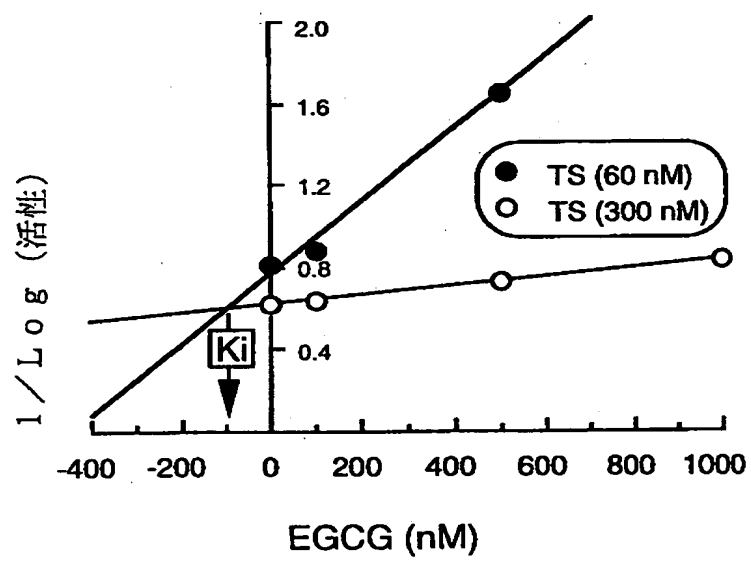
【図1】



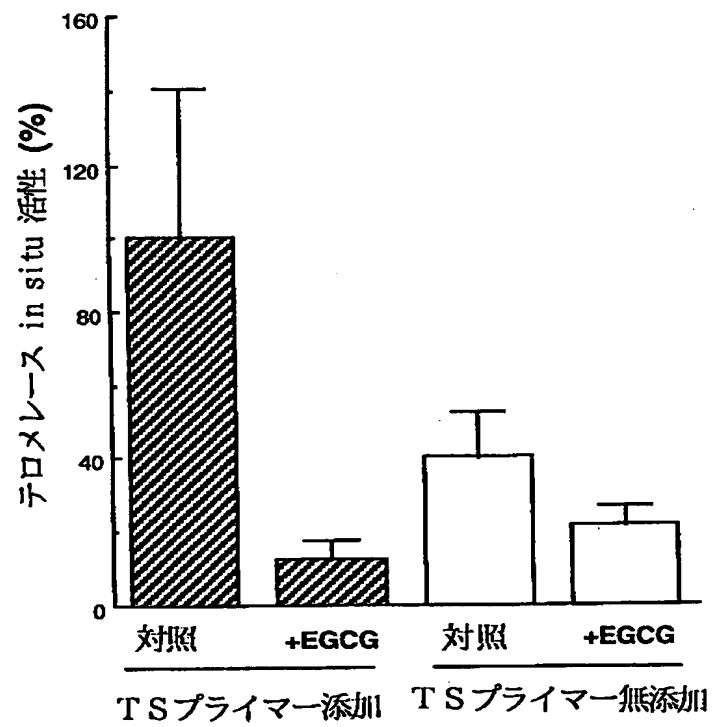
【図2】



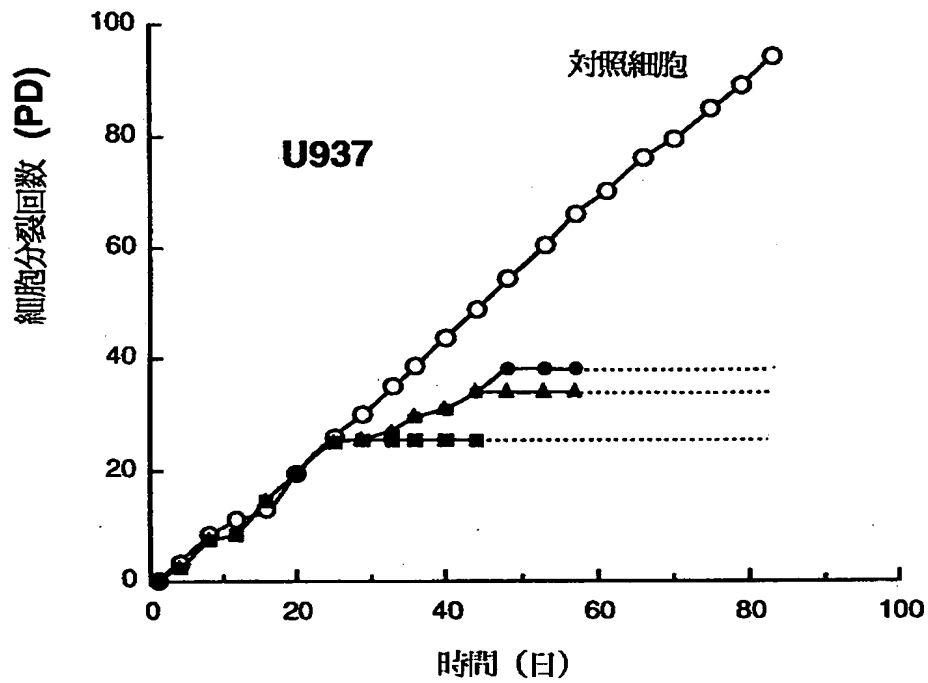
【図3】



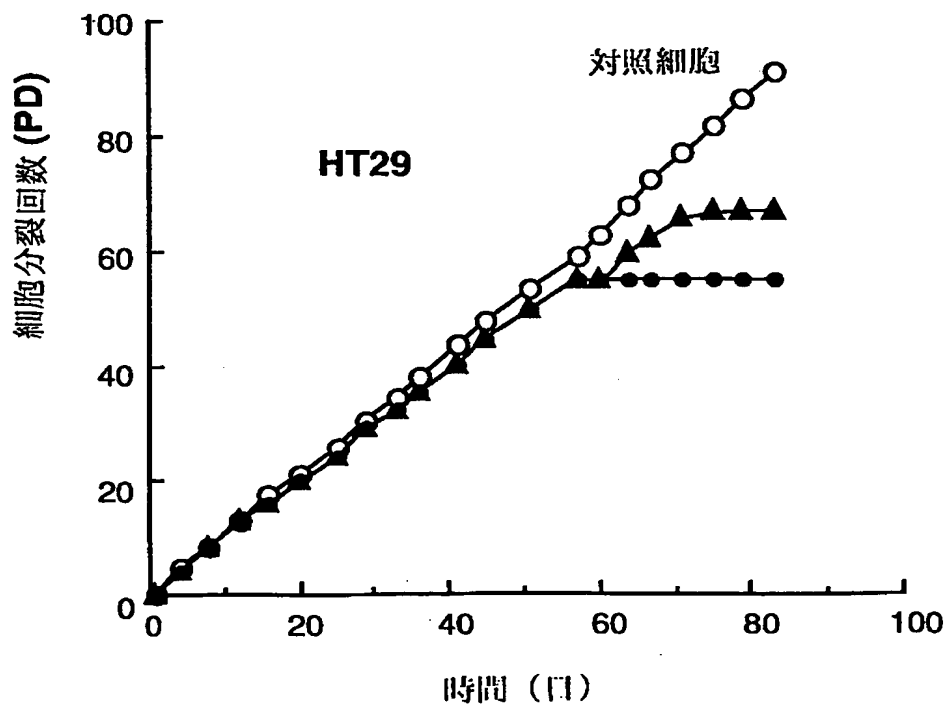
【図4】



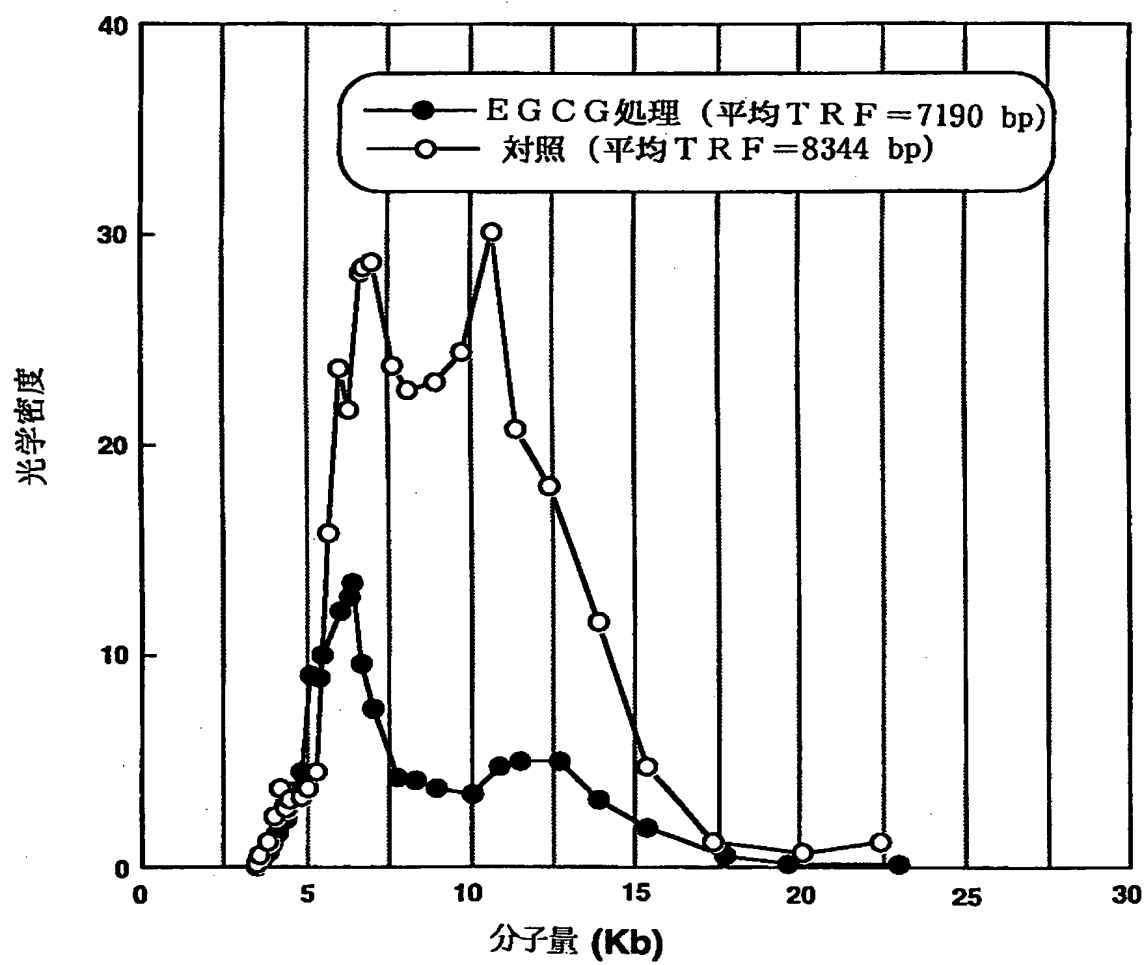
【図5】



【図6】



【图7】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 テロメア及びテロメラーゼと癌との関係の解明や、癌予防及び癌治療において有用なテロメラーゼ阻害活性を有し、医薬用としての安全性や好適な特性を有するテロメラーゼ阻害剤を提供することにある。

【解決手段】 カテキン、なかでもエピガロカテキンガレートの有効成分としてテロメラーゼ阻害剤を構成する。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000173588  
【住所又は居所】 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号  
【氏名又は名称】 財団法人癌研究会

【特許出願人】

【識別番号】 591031452  
【住所又は居所】 神奈川県南足柄市塚原4828-15  
【氏名又は名称】 鶴尾 隆

【特許出願人】

【識別番号】 591014972  
【住所又は居所】 東京都渋谷区本町3-47-10  
【氏名又は名称】 株式会社 伊藤園

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100070219  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル  
8階 若林国際特許事務所  
【氏名又は名称】 若林 忠

【選任した代理人】

【識別番号】 100100893  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル  
8階  
【氏名又は名称】 渡辺 勝

【選任した代理人】

【識別番号】 100088328  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル  
8階  
【氏名又は名称】 金田 暢之

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル  
8階  
【氏名又は名称】 石橋 政幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

特平 9-361282

【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル  
8階 若林国際特許事務所  
【氏名又は名称】 伊藤 克博

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173588]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号

氏 名 財団法人癌研究会

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591031452]

1. 変更年月日 1991年 1月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県南足柄市塚原4828-15  
氏 名 鶴尾 隆

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591014972]

1. 変更年月日	1992年 8月21日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都渋谷区本町3-47-10
氏 名	株式会社 伊藤園